

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-92290

(43) 公開日 平成8年(1996)4月9日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/47		8318-4H		
A 6 1 K 38/00	A E D			
C 0 7 K 7/08		8318-4H		
G 0 1 N 33/53	D			
			A 6 1 K 37/ 02	A E D
			審査請求	未請求 請求項の数 5 F D (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願平6-252942

(22) 出願日 平成6年(1994)9月20日

(71) 出願人 392033288

株式会社そーせい

東京都文京区後楽1丁目1番10号

(72) 発明者 御子柴 克彦

東京都三鷹市井の頭2-19-25

(74) 代理人 弁理士 廣瀬 孝美

(54) 【発明の名称】 イノシトールポリリン酸結合ペプチド

(57) 【要約】

【目的】 イノシトールポリリン酸に結合し得るペプチドを提供することを目的とする。

【構成】 本発明は、特定のアミノ酸配列を有し、イノシトールテトラキスホスフェートなどのイノシトールポリリン酸に結合し得るペプチドからなる。本発明のペプチドはイノシトールポリリン酸と結合するので、イノシトールポリリン酸の作用・機構を研究する際の試薬、カルシウム放出阻害剤などとして有用である。

#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記のアミノ酸配列からなるペプチド又は当該アミノ酸配列を有するペプチドであり、イノシトールテトラキスホスフェート、イノシトールペンタキスホスフェート又はイノシトールヘキサキスホスフェートに対して結合性を有するペプチド。

Gly-Lys-Arg-X<sub>1</sub>-Lys-Lys-Lys-Lys-Thr-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-Lys-Lys

(式中、X<sub>1</sub>はLeu又はIle、X<sub>2</sub>はThr又はSer、X<sub>3</sub>はIle又はValを示す)

【請求項2】 ペプチドが、シナプトタグミンI又はIIのC2Bドメインを構成するペプチド又は当該ペプチドを有するペプチドである請求項1記載のペプチド。

【請求項3】 ペプチドが、シナプトタグミンI又はIIである請求項1記載のペプチド。

【請求項4】 請求項1、2又は3に記載されるペプチドを用いることを特徴とするイノシトールポリリン酸様物質又はイノシトールポリリン酸拮抗物質のスクリーニング方法。

【請求項5】 請求項1、2又は3に記載されるペプチドを有効成分として含有するイノシトールポリリン酸阻害剤。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【産業上の利用分野】本発明はイノシトール（以下、Insと称する）ポリリン酸に対して結合性を有するペプチドに関する。より詳細には、特定のアミノ酸配列を有するペプチドからなるイノシトールポリリン酸結合性ペプチド及びその用途に関する。

##### 【0002】

【従来の技術】細胞はホルモン、神経伝達物質、成長因子等の細胞外の情報（ファーストメッセンジャー）に反応して、的確な細胞応答を示す機構をもっている。細胞外情報のあるものは、生理的な作用によって細胞膜上の受容体（G蛋白連関型）を活性化して、次いでエフェクターであるホスホリパーゼ（PLC）を活性化してホスファチジルイノシトール（PI）の代謝回転を促進する。Ins 1, 4, 5-トリホスフェート（IP3）は、このPI代謝回転で産生される細胞内で情報を伝える物質（セカンドメッセンジャー）の一つである。IP3シグナルは細胞内のカルシウム貯蔵部位（小胞体等）に存在するIP3受容体に作用してカルシウムの放出を誘導し、細胞質内のカルシウムの一過性の上昇を導き、種々のカルシウム依存性の蛋白質や酵素等の機能を調節して多様な細胞応答を誘導する。上記のIP3受容体は既に、マウスやラットの小脳から単離されており特にプルキンエ細胞においてその存在の豊富さが報告されている。

【0003】本発明者等も上記IP3受容体について研

究を続けており、マウスの小脳におけるcDNAのクローニングやその一次構造を決定し、その作用を明らかにしてきた。更に、この精製した当該蛋白質を平面二重膜やリポソーム上で再構成することによってIP3感受性のカルシウムチャンネルの機能について検討を重ねてきている。このIP3は急速に代謝され、リン酸が一つ脱離することによって、Ins 1, 4-ビスホスフェート或いは一つのリン酸が付加されIns 1, 3, 4, 5-テトラキスホスフェート（IP4）に代謝される。また、このリン酸化反応に関与する酵素としてはIns P3 3-キナーゼが関与している。これらホスホイノシチドカスケードの種々の代謝物について、細胞伝達におけるセカンドメッセンジャーとして働いているという仮説は下記の論文に示されているが、上記IP3以外は直接的な証明はなされていなかった（Nature 341, 197-205, 1989）。とりわけ上述のIP4に関してはカルシウムの細胞内への流入を介するホメオスタシスや種々の細胞内のカルシウムのプールの調節に関与しているという仮説が提出されているが、IP4に対する特異的な受容体がまだ見出されていないためIP4の機能については未だ詳細なことは分かっていない。

【0004】一連の研究の中で、1991年にブタの小脳からIP4の高親和性の結合蛋白質の可溶化及び精製が報告され、Theibertらはラットの小脳から2種のIP4結合蛋白質を単離したと報告している（Proc. Natl. Acad. Sci., 88, 3165-3169, 1991）。しかしながら、それらの報告の中においては、そのIP4結合蛋白質の生理的機能については全く不明であった。同様に、Ins 1, 2, 3, 4, 5, 6-ヘキサキスホスフェート（IP6）結合蛋白質も2つのグループより報告されており、そのアミノ酸の部分配列としてクラスリンアセンブリー蛋白質であるAP2であることが明らかにされている。このAP2はおそらくはシナプス小胞のエンドサイトーシスやリサイクルの経路に関与する蛋白質と考えられている（Biochem. Biophys. Res. Commun., 187, 158-163, 1992; Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 8976-8980, 1992）。

【0005】一方、シナプス伝達は、神経終末から神経伝達物質が遊離することによって引き起こされる。神経伝達物質の遊離はシナプス小胞膜とシナプス前膜との融合を伴ういわゆる開口放出によって行われると考えられているが、その分子機構はほとんど明らかにされていない。この開口放出に関与する蛋白質としてシナプトタグミン（synaptotagmin）がある。上記蛋白質は元々、シナプス小胞膜蛋白質として1981年に同定された蛋白質であるが、分子量からp65蛋白質としても知られている（J. Cell Biol., 91, 257-269, 1981）。モノクローナル抗体を用いて調べた結果、本蛋白質は中枢から末梢にわたる広い範囲の神経細胞と副腎髄質細胞や脳下垂体細胞等のある種の内分泌細胞にのみ特異的に見出された。

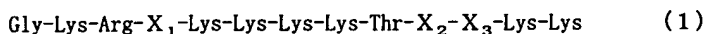
更に細胞分画法や電子顕微鏡観察の結果、この蛋白質は神経においてはシナプス小胞膜や細胞膜の一部に局在することが明らかになっている。1990年には、ラットのcDNAライブラリーから本蛋白質のcDNAがクローニングされ、その一次構造が明らかになっている(Nature 345, 260-263, 1990)。このとき、この蛋白質がシナプス小胞をシナプス前膜へ結合させる役割をもっているのではとの仮説が提唱されている。

【0006】シナプトタグミンの分子構造は分子中に1ヶ所の膜貫通部分を有し、アミノ基側がシナプス小胞内もしくは細胞外に露出している。この部分には糖鎖が結合しており、アミノ酸配列は動物種間で大きく異なっている。細胞質側の部分には、プロテイン キナーゼC

(PKC)の活性制御部位であるC2ドメインと相同な2回の繰返し構造がある。このドメインは動物種間で極めて良く保持されており、Ca<sup>2+</sup>/ホスホリビッドの結合能力がある。このなかでもC2Bドメインは、従来良く研究されているC2Aドメインと異なり、未だ特徴が良く判明していない。すなわち、上記Ca<sup>2+</sup>/ホスホリビッドの結合についてはシナプトタグミンIのC2Aドメインでしか知られていない。またPKCやCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性キナーゼIIによってリン酸化されるアミノ酸配列が見出されている。細胞質側のアミノ酸配列は進化の過程で非常に良く保存されており、シナプス機能におけるこの部分の重要性を示唆している(J. Biol. Chem., 266, 263, 1991; Neuron 6, 993-1007, 1991; J. Biol. Chem., 266, 13548-13552, 1991)。また、ラットには2種類、シビレイでは3種の異なる遺伝子にてコードされるアイソフォームがあることが明らかにされた。脳内のシナプトタグミンの発現分布はアイソフォーム間で異なっており、その生理的意味は未だ不明であるが、細胞膜蛋白質であるニューレキシン(neurexin)、シンタキシン(syntaxin)やN型のカルシウムチャネルと相互作用をしてシナプス小胞と細胞膜との結合や融合に関与する蛋白質と考えられている(Neuron 6, 993-1007, 1991; J. Biol. Chem., 266, 13548, 1991; Science 256, 1820-1823, 1992)。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上述のように、イノシトールポリリン酸は細胞内におけるセカンドメッセンジャーとして重要な役割をはたしている。IP3はその受



(式中、X<sub>1</sub>はLeu又はIle、X<sub>2</sub>はThr又はSer、X<sub>3</sub>はIle又はValを示す)

②ペプチドが、シナプトタグミンI又はIIのC2Bドメインを構成するペプチド又は当該ペプチドを有するペプチドである上記①記載のペプチド；

③ペプチドが、シナプトタグミンI又はIIである上記①のペプチド；

④上記①～③に記載されるペプチドを用いることを特徴

容体が明らかにされており、その結果IP3の作用はかなり明らかになっている。しかし、IP4、Ins 1, 3, 4, 5, 6-ペンタキスホスフェート(IP5)、IP6等のイノシトールポリリン酸については受容体又は結合蛋白質が見出されていない。そのため、IP4等のイノシトールポリリン酸の作用・機能は十分に解明されていない。従って、IP4等のイノシトールポリリン酸に特異的に結合する蛋白質の探索が多く研究者により行われている。かかる蛋白質が見出されれば、IP4等のイノシトールポリリン酸の作用・機能の解明に利用できるとともに、医薬品、診断薬等として有用であり、さらにカルシウム阻害剤、神経伝達物質、ホルモン放出制御物質等のスクリーニングに利用することができる。

【0008】かかる問題から、本発明者等は、IP4の結合蛋白質を鋭意研究した結果、この蛋白質が上述のシナプトタグミンと同一であることを見出し、またIP5及びIP6も本蛋白質と結合することを見出し、既存の蛋白質であるシナプトタグミンが種々のポリイノシトール類の結合蛋白質であることを見出した。更に、本発明者等は、シナプトタグミンにおけるIP4の結合サイトについて検討した結果、IP4はシナプトタグミンのC2Bドメインに結合すること；更に詳細には結合サイトはC2Bドメインの中の特定のアミノ酸配列を有する部分であることを見出した。また、この結合はシナプトタグミンI及びIIに特異的であり、上述したC2Bドメインと同様なドメインを有する蛋白質であるPKC $\alpha$ やrabbophilin等はIP4に結合しないことも併せて見出した。本発明は上記の知見に基づいてなされたもので、本発明の目的はIP4、IP5、IP6等のイノシトールポリリン酸に結合し得るポリペプチド、当該ペプチドを用いたスクリーニング法及び当該ペプチドを含有する薬剤を提供するものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解消するためになされた本発明は、

①下記の式(1)で示されるアミノ酸配列からなるペプチド又は当該アミノ酸配列を有するペプチドであり、イノシトールテトラキスホスフェート、イノシトールペンタキスホスフェート又はイノシトールヘキサキスホスフェート(以下、便宜上、これらをイノシトールポリリン酸と称する)に対して結合性を有するペプチド；

とするイノシトールポリリン酸様物質又はイノシトールポリリン酸拮抗物質のスクリーニング方法；

⑤上記①～③に記載されるペプチドを有効成分として含有するイノシトールポリリン酸阻害剤；である。

【0010】本発明のペプチドは、イノシトールポリリン酸に対して結合性を有し、且つ前記式(1)で示されるアミノ酸配列からなるペプチド又は当該アミノ酸配列を有するペプチドからなる。前述のように、本発明者ら

は、イノシトールポリリン酸に対する結合蛋白を探索してきたが、後記実施例に示されるように、当該結合蛋白はシナプトタグミンであることが判明した。そして、更に検討を重ねた結果、イノシトールポリリン酸との結合部位は、シナプトタグミンのC2Bドメインにあり、より詳細には前記式(1)で示されるペプチド部分であることが明らかになった。即ち、前記式(1)のアミノ酸配列からなるペプチド及び当該ペプチドを含むペプチドは、イノシトールポリリン酸と結合することができる。

【0011】上記の前記式(1)のアミノ酸配列からなるペプチド及び当該ペプチドを含むペプチドは、固相合成法などの慣用のペプチド合成法により調製できる。また、当該ペプチドを含有する天然物から得ることもでき、かかる天然ペプチドとしては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、イカ、シビレ、エイ、ショウジョウバエ、線虫などのシナプトタグミンI及びII、これらのシナプトタグミン類のC2Bドメイン等を例示することができる。また、上記の目的とするペプチドをコードするDNAを調製し、適当な発現ベクターに組み込み、当該発現ベクターで適当な宿主(例えば、大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物細胞、動物細胞等)を形質転換し、次いで形質転換体を培養し、その培養上清(及び培養細胞を破碎した後の上清)を、常法に準じて精製することにより目的とするペプチドを得ることもできる。なお、本発明のペプチドは、糖鎖を含有していてもよい。

【0012】本発明のペプチドは、イノシトールポリリン酸に対して結合性を有する。従って、本発明のペプチドを用いることにより、イノシトールポリリン酸と類似した生理活性を有する物質又はイノシトールポリリン酸と拮抗する物質のスクリーニングを行うことができる。例えば、 $[^3\text{H}]$ などで標識したイノシトールポリリン酸の存在下、試験物質と本発明のペプチドを反応させ(競合反応法)、本発明ペプチドへの標識イノシトールポリリン酸の結合量が減少すれば、試験物質はイノシトールポリリン酸と類似の生理活性を有する物質であることが推察される。前述のように、イノシトールポリリン酸は細胞内で受容体と結合し、カルシウムの放出、神経伝達物質の放出、ホルモンや酵素の調節などの作用を果たしていると推定される。従って、本発明のスクリーニング法によれば、細胞内におけるカルシウム放出物質、神経伝達物質放出物質などのスクリーニングを行うことができる。

【0013】また、本発明のペプチドはイノシトールポリリン酸と結合することから、イノシトールポリリン酸の阻害剤として作用する。本発明のイノシトールポリリン酸阻害剤はかかる作用を利用したもので、本発明のペプチドを有効成分として含有することからなるイノシトールポリリン酸阻害剤である。イノシトールポリリン酸は、上述の作用を有すると考えられるので、本発明のイノシトールポリリン酸阻害剤は、カルシウム阻害剤、神

経伝達物質放出阻害剤、ホルモン遊離阻害剤などとして利用することができる。上記の阻害剤は、種々の製剤形態(例えば、液剤、固形剤、カプセル剤等)で投与し得るが、一般的には有効成分である本発明ペプチドのみ又はそれと慣用の担体と共に注射剤又は経口剤とされる。当該注射剤は常法により調製することができ、例えば、本発明ペプチドを適切な溶剤(例えば、滅菌された水、緩衝液、生理食塩水等)に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。また、経口薬としては、例えば、錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、軟又は硬カプセル剤、液剤、乳剤、懸濁剤、シロップ剤などの剤形に製剤化され、これらの製剤は製剤化の常法に準じて調製することができる。製剤中の本発明ペプチド含量は、剤形、適用疾患などに応じて適宜調整することができる。

【0014】製剤化に際して、好ましくは安定化剤が添加され、安定化剤としては、例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、グリシン、マンニトール、グルコース、デキストラン、ソルビトール、エチレングリコールなどが挙げられる。さらに、本発明の製剤は製剤化に必要な添加物、例えば、賦形剤、溶解補助剤、酸化防止剤、無痛化剤、等張化剤等を含んでいてもよい。液状製剤とした場合は凍結保存、または凍結乾燥等により水分を除去して保存するのが望ましい。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水などを加え、再溶解して使用される。本発明の阻害剤は、その製剤形態に応じた適当な投与経路により投与され得る。その投与量は、患者の症状、年齢、体重などにより適宜調整される。

【0015】なお、本発明のペプチドは、イノシトールポリリン酸の測定(定量又は定性)試薬、慣用の不溶性担体に本発明のペプチドを固定化したアフィニティー担体等とすることによりイノシトールポリリン酸の精製試薬などとしても利用することができる。

【0016】以下、本発明をより詳細に説明する。本発明者等は、ホスホイノシチドカスケードが小脳の機能に大変密接な働きをもっていることから、小脳を用いてIP4結合蛋白質の精製単離を行った。すなわち、IP3受容体がプルキンエ細胞に豊富にあること、同様にInsP3 3キナーゼも同様にプルキンエ細胞に局在化していることから、これらの細胞においてはIP4も生成していることが推察された。また、従来の報告においては、イノシトールリン酸の結合活性が比較的高くみられていることから、プルキンエ細胞の神経的な機能においてポリイノシトールホスフェートの関与が強く示唆されている。

【0017】そこで、本発明者等は、まず界面活性剤にて可溶化を行った。この操作によってIP4結合能に影響を与えるIP3受容体、イノシトールポリホスフェイトホスファターゼやキナーゼ類が抽出されるが、これらの蛋白質はヘパリンアガロースクロマトグラフィーにて

除去した。すなわち、ホスファターゼやキナーゼ類は流出液中もしくは0.5Mの画分に除去され、IP3受容体は0.5M NaCl中へ除去される。従来報告のあったIP4結合蛋白質の精製法との違いはおそらく界面活性剤の種類の違い、ヘパリンアガロースゲルの挙動の違い、イオン交換カラムの違いによるものである。このとき若干のIP4活性が流出液中に見られたが、これはおそらくIP4結合蛋白質の重合体によるものと考えられた。

【0018】次にイオン交換クロマトグラフィーDE-52にて残る夾雑物を除去した。このとき、目的とする蛋白の他に低分子化合物が残ったため二回目のゲル濾過にて除去した。各クロマトグラフィーにおける溶出パターンを図1に示す。最後のSephacrose CL6Bによる分離をした後、目的画分をSDS-PAGEにより分析したところ、分子量140kと65kの蛋白質のバンドが得られた(図2参照)。またCBB染色をしたところ、目的とするIP4結合活性の強度と非常に良く一致した。2回目のゲル濾過のとき、界面活性剤の存在下で140kを示したことから、この分子量の蛋白質は65kの蛋白質の二量体と考えられた。以上述べてきたように、本発明者等はマウスの小脳150gから0.45mgの目的とするIP4の結合蛋白質を単離することに成功した。

【0019】こうして得られた蛋白質のアミノ酸配列を決定するために、本発明者等は以下の方法を用いた。すなわち、140kと65kの蛋白質をPVDF膜に移しかえ、0.05%のSDS存在下にてリジルエンドペプチダーゼにて加水分解を行った。次に残ったペプチドを逆相クロマトグラフィーにて分離した。この結果、140kの蛋白質はマイナー蛋白であったにもかかわらず、この140k由来のペプチドがこの分離においては多く回収された。こうして得られた140k由来のペプチドの内、7種についてアミノ酸配列を決定し、SWISS PROTデータベースを用いて検索したところ、ラットのシナプトタグミンIIのアミノ酸配列と完全に一致した(図3参照)。従来技術にて述べたように、シナプトタグミンは前シナプスにおけるシナプス小胞の結合と融合に役割を果たす蛋白であると考えられている(Science 259, 780-785, 1993; Neuron 6, 665-677, 1991)。ネイティブのラットのシナプトタグミンは二重体を形成し、前シナプス蛋白質と高分子量の複合体を形成することが知られている。

【0020】また、cDNA解析によれば、2種のシナプトタグミン(I, II)の存在が知られており、RNAプロッティング分析では異なった分布が知られている(J. Biol. Chem., 266, 13548-13552, 1991)。すなわち、シナプトタグミンIIは脳内においては系統的に古い部分に存在する。例えば、脊髄、脳幹、小脳等である。一方、シナプトタグミンIは比較的新しい領域、す

なわち、大脳皮質や海馬などに存在する。本発明においては、シナプトタグミンIIしか得られなかったのは、上述のように小脳においてはシナプトタグミンIIの方が大部分を示すことに他ならない。

【0021】本発明者等は、さらに上述のごとく得られた蛋白質がラットシナプトタグミンIIであることを、以下の方法にて証明した。通常の方法にて合成したラットシナプトタグミンIIのc末端(409-422)とPKCの調節領域と相同性のあるC2ドメインに相当するペプチドに対する抗体で、本発明の界面活性剤にて抽出されたサンプル及び最終段階にて得られたサンプルとをウェスタンブロット法によって試験したところ、それぞれ140k及び65kの蛋白質が反応しクロスリアクトした(図4参照)。また、C2Aの抗体により用量依存的にIP4結合活性をもつ蛋白質は免疫沈降した(図5参照)。これらのことをもって、本発明者等は上述のように、精製純化した蛋白質はまさにマウスのシナプトタグミンIIであることを見出した。

【0022】次に本発明者等は、この精製したIP4結合蛋白/シナプトタグミンの特徴を調べるために以下の方法を用いた。まず、常法に基づき、IP4結合に対するpH依存性を研究した(図6参照)。4.8μMの非標識のIP4の存在下では、標識したIP4の最大結合能はおおよそpH5.0あたりに見られている。

【0023】精製したサンプルにおける標識化したIP4の非標識のIP4による置換をpH5.0、6.2、7.4で行ったところ、pH6.2のとき30nMで、pH7.4のとき40nMで、pH5.0のとき170nMで約半減した。スカッチャド分析(Scatchard analysis)を行った結果、KdはpH6.2及び7.4のとき約30nMであり、pH5.0のとき160nMであった(図7参照)。BmaxはpH6.2、7.4、5.0のとき、それぞれ2.7pmol、2.4pmol、3.5pmol/蛋白であった。Hill係数はそれぞれのpHには依存しないで、ほぼ1.0であった。

【0024】次に、IP4結合部位における特異性を種々のイノシトール誘導体を用いることによって検討した。その結果を図8に示す。図示したとおり、IP5は高い強度にて標識したIP4の結合を置換した。この置換能力の強さはIP4に比較して強かった。イノシトール3,4,5,6-テトラキスホスフェートやイノシトールヘキサキスホスフェートは、100nMでIP4の結合を約半分抑制した。しかし、イノシトールヘキサキスホスフェートの場合には置換曲線の勾配は比較的鋭く、併せて10nMで標識IP4の結合を増加させた。また、300nMのとき、IP4と同様に強い標識したIP4結合の抑制が見られた。このことはアロステリックな影響を示していた。他の用いたイノシトールの誘導体では比較的親和性が低かった。以上のように、本発明者等はマウスの小脳から高親和性のIP4結合蛋白

質の単離精製に成功し、その結合蛋白質であることの確認及び特徴づけを行った。

【0025】次に、本発明者等は、上記IP4が結合蛋白質のどの部分と結合し、ドメインの機能がいかなるものか研究した。まず、IP4結合ドメインを知るためにマウスIP4結合蛋白/シナプトタグミン(IP4BP/syt II)のcDNAのクローニングを行った。マウスの小脳のcDNAライブラリーから、前述した部分アミノ酸配列に相当するPCRプライマーによって作成したcDNAを用いることによってスクリーニングした。一つの翻訳部分を含んだcDNAの配列は5つの重複するクローンによって決定した。こうして得られたマウスのIP4BP/syt IIの塩基配列を配列番号1に示す。また、当該塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号2に示すが、予想されるように、前述したIP4結合蛋白質の配列と同一であった。イニシエーションコドンも公知のKozak配列と同一であった。ラットのシナプトタグミンIIと比較すると4種のアミノ酸配列がN末にて異なっているのみであった。すなわち、12番目のIleがAsn、27番目がAlaからVal、39番がThrからPro、52番目がAspからGluへ変化していた。3'の非翻訳領域はラットのcDNAでも同一であり、TGジヌクレオチドの繰返し構造を含んでいた。

【0026】次に、遺伝子発現IP4BP/syt IIの結合活性を確認するために、以下の実験を行った。こうして得られたcDNAをもつ発現プラスミドを作成し、通常のCOS細胞にトランスフェクトした。こうして発現させた細胞のホモジェネートは通常のSDS-PAGEにかけ、その後抗IP4BP/syt II抗体にてイムノブロット分析を行った(図9A参照)。その結果、分子量約60kであり、小脳から得たIP4BP/syt IIと比較して若干低かったが、これは糖鎖の違いに帰するものである。この発現化した蛋白質を次に可溶化して、ヘパリンアガロースカラムにて部分純化した。こうして精製したIP4BP/syt IIを、前述した方法でIP4活性を調べたところ、小脳由来のIP4BP/syt IIと同一であった(図9B参照)。

【0027】次に、IP4BP/syt IIのIP4結合ドメインを解析するために、膜貫通領域を除いたIP4BP/syt IIとGSTの融合蛋白を発現した。IP4結合能をマップした結果、C2Bドメインのアミノ酸番号315-346(IHLMQNGKRLK KKKTTVKKKTLNPFNFESFSF; 即ちIle-His-Leu-Met-Gln-Asn-Gly-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Lys-Lys-Thr-Thr-Val-Lys-Lys-Lys-Thr-Leu-Asn-Pro-Tyr-Phe-Asn-Glu-Ser-Phe-Ser-Phe-)が結合に重要であることが判明した(図10参照)。しかも、その領域はリジンリッチであることが判明した。また、驚くべきことに、

この結合領域は、イカシナプトタグミンのPep2ペプチドと極めて似ていることが明らかとなった(Nature 363, 163-165, 1993)。更に、シナプトタグミンのC2Aドメイン、PKC $\alpha$ 及びrabphilin 3AのC2ドメインのアミノ酸配列並びにこれらのドメインとIP4との結合性を詳細に検討した結果、IP4の結合部位は上記配列の内のGKRLKKKKTTVKK(即ち、Gly-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Lys-Lys-Thr-Thr-Val-Lys-Lys-)部位であることが明らかになった。そして、マウス以外の動物のシナプトタグミンC2Bドメインについても検討した結果、前記式(1)で示されるペプチド部分がIP4との結合に不可欠であることが判明した。

【0028】また、精製GST-fに対するIP4結合のスカッチャド分析をしたところ、Kdは165nM、Bmaxは3.8pmol/ $\mu$ g蛋白であった(図11A参照)。このKd値は、精製した小脳由来IP4BP/syt IIより高いことも分かった。また、そのIP4に対する親和性の低さはGSTとの融合に起因すると予想される。当該GST-syt II-C2Bに対するIP4結合能を比較すると、Ins 1, 2, 3, 4, 5, 6-P6(IP6) > Ins 1, 3, 4, 5, 6-P5(IP5) > Ins 1, 3, 4, 5-P4(IP4) > Ins 2, 4, 5-P3 > Ins 1, 4, 5-P3(IP3) > Ins 1, 4-P2であった(図11B参照)。つまり、IP6及びIP5はIP4に競合的であった。これらのことから、IP4BP/syt IIのC2BドメインはIP4だけでなく、IP6及びIP5とも結合することが判明した。

【0029】精製小脳由来IP4BP/syt IIに対しても、IP6を除いて同様の結果が得られた。また、ヘパリンはIP4のIP4BP/syt IIへの結合阻害を示すが、GST-syt II-C2Bでも同様であった。C2ドメインは、シナプトタグミンI、PKC $\alpha$ やrabphilin 3Aにも存在することが知られている(Mol. Cell Biol., 13, 2061-2068)。そこで、C2Bドメインに対するIP4結合が、IP4BP/syt IIにユニークであるかどうかを確認したところ、IP4の結合はシナプトタグミンI及びIIのC2Bドメインに特異的であることが判明した(図12参照)。

【0030】最近、シナプトタグミンIのC2Aドメインが、Ca<sup>2+</sup>依存性ホスホリビッド結合に十分であるとの報告があった。シナプトタグミンのC2Bドメインも同様であると考えられるが、その詳細は不明である。シナプトタグミンのC2Bドメインに対するイノシトールホスフェートとホスホリビッド結合の関係を明らかにすべく、GST融合蛋白でホスホリビッド結合試験を実施した(図14参照)。その結果、GST-syt I-C2AとGST-syt II-C2AはCa<sup>2+</sup>依存的にリポソーム(1:1(W/W)ホスファチジルセリ

ン：ホスファチジルエタノールアミン)に結合したが、GST-syt I-C2BとGST-syt I-C2Bは $Ca^{2+}$ 非依存的に結合することが判明した。また、GST-rabphilin 3A(rph)-C2Aは $Ca^{2+}$ 依存性にホスホリピッド結合活性を有するが、GST-rph-C2Bは、 $Ca^{2+}$ 存在下でも結合しないことが判明した。すなわち、シナプトタグミンやrabphilin 3AのC2Aドメインは、PKC $\alpha$ のC2ドメインにその機能が類似して $Ca^{2+}$ 依存性であるが、C2Bドメインは異なることが示唆される。GST-syt I-C2Bの327番目のアミノ酸をリジンからグルタミンに変えるとホスホリピッド結合活性が失われるが、IP4結合活性は50%維持された。

#### 【0031】

【発明の効果】本発明によれば、イノシトールポリリン酸と結合するペプチドが提供される。本発明ペプチドはイノシトールポリリン酸と特異的に結合するので、イノシトールポリリン酸の作用・機能を研究する際の試薬やイノシトールポリリン酸の精製試薬として有用である。また、上記ペプチドを用いる本発明のスクリーニング法によれば、イノシトールポリリン酸と同様な生理活性を有する物質又はイノシトールポリリン酸と拮抗する物質のスクリーニングが可能となる。更に、上記ペプチドを有効成分として含有する本発明のイノシトールポリリン酸阻害剤によれば、イノシトールポリリン酸の作用を阻害することができるので、カルシウム阻害剤、神経伝達物質放出阻害剤、ホルモン遊離阻害剤などとして有用である。このように、本発明のペプチドは、イノシトールポリリン酸の作用を研究する上での試薬や精製試薬、イノシトールポリリン酸様物質のスクリーニング試薬、イノシトールポリリン酸が関与する各種疾患の診断試薬、治療(予防)用薬剤などとして広く利用することができる。

#### 【0032】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

##### 実施例1

##### ①IP4結合蛋白(IP4BP)の精製

ddYマウス由来小脳150gを9容量の緩衝液[0.32M スクロース、1mM EDTA、0.1mM P

MSF(フェニルメチルスルホニル フルオリド)、10 $\mu$ M ロイペプチン、10 $\mu$ M ペプスタチン、1mM 2-ME、5mM トリス塩酸、pH7.4]と混合し、ポッターホモゲナイザーでホモゲナイズした。ホモゲネートは、2℃、1000 $\times$ gで5分間遠心し、ペレットは同条件で洗浄した。上清及び洗浄液を合わせ、2℃、10万gで60分間遠心し、P3+P4膜画分を沈殿させた。

【0033】膜画分を緩衝液(1mM EDTA、0.1mM PMSF、10 $\mu$ M ロイペプチン、10 $\mu$ M ペプスタチンA、1mM 2-ME、50mM トリス塩酸、pH8.0)で懸濁し、20%(w/w)トリトンX-100を加え蛋白濃度を3.0mg/ml、トリトンX-100濃度を1%に調製した。更にその10万g遠心上清をヘパリン-アガロースカラム(2 $\times$ 13.7cm)にアブライした。なお、当該カラムは、0.2%トリトンX-100、10%グリセロール、10 $\mu$ M ペプスタチンA、10 $\mu$ M ロイペプチン、0.1mM PMSF、1mM 2-ME、50mM トリス塩酸、pH8.0(緩衝液1と称する)に0.25M NaClを含む緩衝液で予め平衡化したものである。次に、カラムを0.25M NaCl/緩衝液1及び0.5M NaCl/緩衝液1で洗浄し、IP4BPを30mlの1M NaCl/緩衝液1で溶出した。

【0034】更に、溶出画分を濃縮し、セファロースカラムCL-6B(1.0 $\times$ 60cm、0.2M NaCl/1mM/緩衝液1で平衡化)にアブライし、IP4BP画分を回収した(図1a参照)。なお、回収した画分は、図中にバーを付して示した(図b及びcにおいても同様)。回収した画分を、1mM EDTA/緩衝液1に対して透析し、次いでDE52カラム(1.0 $\times$ 7.6cm)にアブライした。IP4BP画分を、1mM EDTAを含む緩衝液1を用い、0-0.3M NaClグラディエントで溶出した(図1b参照)。更に、溶出画分を、再度セファロースCL-6Bでリクロマトすることにより精製し(図1c参照)、精製物を-80℃で保存した。また、当該精製工程における回収率等を表1に示す。

#### 【0035】

##### 【表1】

表1

精製工程	蛋白 (mg)	IP4結合 ( $\mu\text{mol}$ )	比活性 ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )	収率 (%)	精製度 (倍)
P2+P3膜画分	3740	12	0.00*	100	1
トリトンX抽出物	2787	28	0.01	85	3.3
ヘパリン-アガロース	14	4.8	0.34	15	113
セファロース CL-6B	4.2	2.7	0.64	8.2	213
DE-52	1.8	1.4	1.08	4.2	360
セファロース CL-6B	0.45	1.1	2.44	3.3	813

\* : 推定 0.003

## 【0036】実施例2

## SDS-PAGEによる分析

上記の精製工程におけるIP4BP画分をそれぞれSDS-PAGE (3.75-12.5%のグラディエントゲルによるLaemmli法) に供した。なお、ゲル染色にはCBBを用いた。その結果を図2Aに示す。図において、レーンb: 界面活性剤による可溶化画分80 $\mu\text{g}$ ; レーンc: ヘパリンアガロース画分30 $\mu\text{g}$ ; レーンd: セファロースCL-6B画分10 $\mu\text{g}$ ; レーンe: DE-52画分2 $\mu\text{g}$ ; レーンf: セファロースCL-6Bリクロマト画分2 $\mu\text{g}$ のSDS-PAGEパターンを示す。なお、レーンaは分子量マーカー( $\times 10^3$ )であり、200: ミオシン; 116:  $\beta$ -ガラクトシダーゼ; 92: ホスホリラーゼ; 66: ウシ血清アルブミン; 45: オボアルブミンを示す。また、図2Bに、セファロースCL-6Bリクロマトの63~81画分のSDS-PAGEパターンを示す。上記SDS-PAGEによるIP4BPの分子量測定値は、140K及び65Kであった(図2C参照)。また、140K分子は65K分子の2量体であることも判明した。

## 【0037】実施例3

[ $^3\text{H}$ ] IP4結合性の測定

IP4結合測定は、PEG沈殿法によった(Maeda, N. E. NBO. J., 9, 61-67, 1990)。クロマト各画分測定は、[ $^3\text{H}$ ] IP4を各画分50 $\mu\text{l}$ に9.6nMになるように添加した。そのサンプルは、0℃で10分間インキュベート、2 $\mu\text{l}$ のウシーガンマーグロブリン(50mg/ml)と混合し、50 $\mu\text{l}$ の30%PEG6000/50mMトリス塩酸(pH8.0)をサンプルに加え、0℃で5分間インキュベートした。次に、1wg遠心上清を除去し、沈殿を500 $\mu\text{l}$ のSOLVABLEに溶解させた。ラジオアクティビティは、液体シンチレーション試薬として5mlのアクアソルII (Aquasol II)を加えて測定した。非特異結合は10 $\mu\text{M}$ の非ラベルIP4存在下で測定した。更に、生化学的性状解析のために、別のIP4結合測定法も用いた。10 $\mu\text{l}$  [ $^3\text{H}$ ] IP4 (最終濃度4.8nM)、10 $\mu\text{l}$  ガンマーグロブリン (最終濃度50 $\mu\text{g}$ )、10 $\mu\text{l}$  の0.5Mグッド緩衝液、10 $\mu\text{l}$  のイノシトールリン酸液(50mM He

pes-NaOH、pH7.4で希釈)、サンプル及び蒸留水で全100 $\mu\text{l}$ に調整した。0℃で10分間インキュベートした後、30%PEG溶液を100 $\mu\text{l}$ 加え、上記のように測定した。

## 【0038】実施例4

## IP4BPペプチドの同定

実施例1で得た精製IP4BP (約0.3mg) をSDS-PAGE (3.75-12.5%のグラディエントゲル) に供し、分離した蛋白をPVDF膜にトランスファーして140Kと65K蛋白相当バンドをプロットから切り出し、0.5mM NaOH処理し、microfuge-tube中で還元、アルキル化した。2%アセトニトリルで洗浄後、膜片をリジルエンドペプチダーゼで24時間、37℃で処理した。その濃度は、7.5%アセトニトリルと0.05%SDSを含む100mMトリス塩酸(pH8.5)の300 $\mu\text{l}$ 中で、IP4BPが1/50モル濃度になるように調整した。膜片は1wgで5分間遠心して除去し、上清を凍結乾燥後、0.1%TFAに溶解しHPLCカラム[Waters 600E、C8 ( $\mu$ BONDASPHERE 300A Waters)、カラム形状0.39 $\times$ 15cm]にアプライした。0-30% 2-プロパノール/アセトニトリル(7:3) (含0.1%TFA) のグラディエントを45ml以上になるように実施した(0.5ml/分)。ペプチドピークは215nmでモニターし回収した(図3A参照)。図に示されるように、140Kが65Kの2量体であることが確認された。次いで、140Kの主ピーク(図3Aに示した、1-7の7つのピーク)を100 $\mu\text{l}$ 以下に濃縮し、ガスフェーズシーケンサー(Applied Biosystem)に供し、それぞれのアミノ酸配列を決定した。各ペプチドフラグメントのアミノ酸配列をラット由来シナプトタグミンII配列と比較した(図3B参照)。その結果、当該アミノ酸配列は、ラット由来シナプトタグミンII配列と一致した。

## 【0039】実施例5

## シナプトタグミンIIのC2Aドメイン及びC末端領域ペプチドに対する抗体の作製

(1) ラット由来シナプトタグミンIIのC2Aドメイン(アミノ酸配列番号: 139-267)とグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GSTと称する)の融合

蛋白を大腸菌で発現させて精製した (Smithらの方法による; Gene 67, 31-40, 1988)。即ち、ラット由来シナプトタグミン I I の C 2 A ドメインをコードする cDN A を常法に準じて PCR 法により増幅・調製し、pGE X-2 T ベクターにサブクローニングし、融合蛋白を大腸菌 JM109 で発現させた。菌体をソニケーションし、トリトン X-100 で最終濃度が 1% になるように処理した。更に、1 万 g 遠心上清をグルタチオンセファロース CL-6B によるアフィニティカラムに付し、当該融合蛋白を精製した。精製品は 10% SDS-PAGE で分析確認後、リン酸緩衝液 (生理食塩水) に透析し、ニュージーランドホワイトウサギの背中に皮下注射した。なお、蛋白溶液 1 mg/ml とフロイントコンブリートアジュバント 1 ml を混合し免疫した。また、2 週間後にブースターした後、常法に準じて抗体を得た。

【0040】(2) ラット由来シナプトタグミン I I の C 末端領域ペプチド (アミノ酸配列番号: 409-422) のアミノ末端にシステインを付加し、ウシ血清アルブミンに結合させた。当該アルブミンは、フリーのスルヒドリル基と反応し得るマレイミド基を有するヘテロビファンクショナルクロスリンカーに結合したものである (sulfo-SMCC-cBSA)。5 mg の C 末端ペプチドと 5 mg の sulfo-SMCC-cBSA を、1 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.2 (0.1 M EDTA, 0.15 M NaCl を含) 中で混合し、室温で 3 時間攪拌させながら反応させた。未反応物はセファデックス G-25 カラムでゲル濾過で除去した (0.083 M リン酸緩衝液 pH 7.2 及び 0.15 M NaCl 条件下)。ペプチド-cBSA 複合体を含有するボイド画分を、アジュバントとして水酸化アルミニウムを用い、上記と同様にニュージーランドホワイトウサギに免疫し、常法に準じて抗体を得た。

#### 【0041】実施例 6

##### イムノプロット法及び免疫沈降法による分析

###### (1) イムノプロット法

実施例 1 における可溶化画分 (粗精製蛋白) 及びセファロース CL-6B リクロマト画分 (精製蛋白) を SDS-PAGE (3.75-12.5% の Laemmli 系) に供し、蛋白を PVDF 膜にトランスファーした後、上記の抗体と反応させた。その結果を図 4 に示す。同図において、レーン a は可溶化上清 50 µg; レーン b はセファロース CL-6B リクロマト画分 3 µg であり、アミノブラックで染色したもの (A)、C2A 領域に対する抗体で反応させたもの (B)、C 末端領域に対する抗体で反応させたもの (C)、コントロール抗体で反応させたもの (D) を示す。なお、検出に用いるペルオキシダーゼ活性は、Vectastain ABC キットで DAB 染色を行った。図に示されるように、ラット由来シナプトタグミン I I の C 末端アミノ酸配列 (409-422) 及び C 2

A 領域 (139-267) に対する抗体は、140 K 及び 65 K の何れとも反応することが判明した。

###### 【0042】(2) 免疫沈降法

抗 C2A 抗体 10 µl (抗体濃度は IgG として、2、5、10 µg/10 µl・50 mM Hepes-NaOH, pH 7.4, 0.1 M NaCl)。また、当該抗体は Amersham 製 プロテイン A カラムで精製したものを精製 IP4BP (0.35 µg) に添加し、0.1 M NaCl を含む Hepes-NaOH (pH 7.4) 緩衝液中で室温 30 分間インキュベートした。次に、同緩衝液で懸濁させた プロテイン A-セファロース CL-6B 懸濁液 30 µl (プロテイン A パウダー 0.3 mg) を加え、当該チューブを 4℃ で 30 分間ゆるやかに振盪させた。更に、プロテイン A-セファロース CL-6B 粒子を 1 万 g 遠心することにより沈殿させ、上清 25 µl の残存 [<sup>3</sup>H] IP4 結合活性を前述の PEG 沈降法で測定した。なお、コントロール実験はウサギ免疫前の IgG 画分を用いて同様に実施した。その結果を、図 5 に示す。同図において、○は抗 C2A 抗体を、●はコントロール抗体を示す。また、% 阻害 (▲) は、コントロール IgG での活性から抗 C2A 抗体での活性を差し引いた残存活性を示す。図に示されるように、抗 C2A 抗体は用量依存的に精製 IP4BP の IP4 結合活性を低下させた。上記 (1) 及び (2) の結果は、実施例 4 に示した部分アミノ酸配列の分析結果とあわせて、マウス由来精製 IP4BP は、明らかにマウス由来シナプトタグミンであることを説得せしめる。

###### 【0043】実施例 7

##### 精製 IP4BP の IP4 結合活性の性状解析

精製 IP4BP の IP4 結合における pH 依存性を図 6 に示した。結合活性は、4.8 nM [<sup>3</sup>H] IP4 と 0.35 µg の精製蛋白を 50 mM Mes-NaOH (pH 4.5-6.7; ○)、50 mM Hepes-NaOH (pH 6.2-7.6; □)、50 mM Epps-NaOH (pH 7.3-8.3; △) 緩衝液で検討した。非特異的結合は 4.8 µM のラベル IP4 存在下で測定した。サンプルは、0℃ で 10 分間インキュベートし、結合は PEG 沈降法により測定した。その結果、至適 pH は 5.0 であることが判明した。

【0044】次に、精製 IP4BP に対する [<sup>3</sup>H] IP4 の結合の飽和性について検討した (図 7 参照)。結合測定には、0.35 µg の精製蛋白で pH 6.2

(△) 及び pH 7.4 (○)、あるいは 0.1 µg の精製蛋白で pH 5.0 (□)、4.8 nM [<sup>3</sup>H] IP4、各種濃度のコールド IP4、及び 50 µg ガンマグロブリンを、100 µl の 50 mM Mes-NaOH (pH 5.0)、50 mM Hepes-NaOH (pH 6.2 及び 7.4) 下で使用した。サンプルは、0℃ で 10 分間インキュベートし、結合は PEG 沈降法により測定した。その結果、結合の Half-maximal reduction

は、pH 6.2では30 nM、pH 7.4では40 nM、pH 5.0では170 nMであった。また、スカッチャード分析では、シングル結合であることを示し、pH 6.2と7.4ではK<sub>d</sub>値が30 nM、pH 5.0では、160 nM、B<sub>max</sub>は、pH 6.2で2.7 pmol、pH 7.4で2.4 pmol、pH 5.0で3.5 pmol/μg 蛋白であることが判明した。

【0045】次に、IP<sub>4</sub>結合サイトの特異性を、5種類のイノシトールポリリン酸を加えることによって検討した。精製蛋白0.35 μgを種々の濃度のIP<sub>3</sub>

(▲)、IP<sub>4</sub> (●)、Ins 3, 4, 5, 6-P<sub>4</sub> (○)、IP<sub>5</sub> (■) 及びIP<sub>6</sub> (□) の存在下で、4.8 nM [<sup>3</sup>H] IP<sub>4</sub>とインキュベートした。結合測定はPEG沈降法で実施した。その結果を図8に示す。図に示されるように、IP<sub>5</sub>はIP<sub>4</sub>よりも

[<sup>3</sup>H] IP<sub>4</sub>を強く置換した。Ins 3, 4, 5, 6-P<sub>4</sub>とIP<sub>6</sub>は、100 nMでIP<sub>4</sub>の結合を半分抑制した。しかし、IP<sub>6</sub>の場合には、置換曲線の勾配は比較的鋭く、また10 nMで [<sup>3</sup>H] IP<sub>4</sub>の結合を増加させた。また、300 nMの時、IP<sub>4</sub>と同様に [<sup>3</sup>H] IP<sub>4</sub>の結合を強く抑制した。このことは、

[<sup>3</sup>H] IP<sub>4</sub>結合におけるIP<sub>6</sub>のアロステリック様効果を意味する。他のイノシトール誘導体では親和性は低かった。

#### 【0046】実施例8

##### マウスIP<sub>4</sub>BPの遺伝子クローニング

実施例4で決定した、IP<sub>4</sub>BPの一部アミノ酸配列K-3ペプチド(VPYQELG; 即ち、Val-Pro-Tyr-Gln-Glu-Leu-Gly) 及びK-2ペプチド(IHLMQ; 即ち、Ile-His-Leu-Met-Gln) に相当する5' GTICCTA (TC) CA (AG) GA (AG) (TC) TIGG 3' 及び5' (TC) TGCATIA (AG) (AG) TG (AGT) AT 3' をPCRのプライマーとして合成した。全RNAはChomczynskiとSacchiの方法(Anal. Biochem., 162, 156-159, 1987)によりマウス小脳より調製し、またポリ(A)<sup>+</sup>RNAはoligotex-dT30 (日本ロシュ) により選択した。

【0047】PCR増幅はAMV逆転写酵素で35サイクル行い、94℃2分間変性し、48℃でアニーリング、72℃3分間鎖伸長を行った。PCR生成物はアガロースゲル電気泳動とGeneclean II kit (Biol 01) で抽出し、マウス小脳由来cDNAライブラリーからの2×10<sup>6</sup>プラークをスクリーニングするのに用いた。ハイブリダイゼーションは、50%ホルムアミド、2×SCC、0.1% SDS、100 μg/ml サケ精子DNA、<sup>32</sup>P-ラベルプローブ(5×10<sup>5</sup> cpm/ml) で42℃12時間の条件で実施した。ハイブリダイズフィルターは0.1×SCCと0.1% SDSで42℃にて2回洗浄した。5つの陽性クローンを選択し、それらのcDNAをpBluescript KS (-) (Str

atagene) にクローン化した。さらに、そのクローンを、BcaBEST Dideoxy Sequencing Kit (Takara Shuzo) で配列決定をした。5つの重複するクローンからシングルオープンリーディングフレームを含む全DNA配列を決定した。当該塩基配列を配列番号1に示す。また、その配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号2に示す。この配列は、前述の部分アミノ酸配列と一致した。配列番号1において、実線を付した部分が既に決定された部分アミノ酸配列を示す。

#### 【0048】実施例9

##### IP<sub>4</sub>BPの発現と機能確認

IP<sub>4</sub>BPのIP<sub>4</sub>結合活性を確認するために発現プラスミド(pEF-IP<sub>4</sub>BP)を調製し、COS7にトランスフェクトし、形質転換体を培養することにより、発現IP<sub>4</sub>BP/syt II (pEF-IP<sub>4</sub>BP/syt II) を調製した。即ち、pEF-BOS (Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990) をXbaIで消化し、クレノフラグメントで平滑化し、NotIリンカーを結合させた。NotIリンカーを結合させた全IP<sub>4</sub>BP/syt II cDNA (1-1590塩基対) を、pEF-BOSのNotIサイトに挿入した。生成したプラスミド(pEF-IP<sub>4</sub>BP) は、ヒトEF1-αプロモーターとヒトG-CSFポリアデニル化配列の間に全長のIP<sub>4</sub>BP/syt II cDNAを有する。DEAE-デキストラン法を用い、プラスミドpEF-IP<sub>4</sub>BP及び対照としてのpEF-BOSをCOS7にトランスフェクトした。トランスフェクト後、48時間培養した。

【0049】培養後、細胞をホモゲナイズし、ホモゲネートをSDS-PAGEに供し、抗IP<sub>4</sub>BP抗体でイムノプロットした。その結果を図9Aに示す。同図において、レーン1はコントロール(pEF-BOSトランスフェクトCOS7のヘパリン結合画分)、レーン2はpEF-IP<sub>4</sub>BP/syt II、レーン3はマウス小脳ミクロゾーム画分を示す。図に示されるように、イムノリアクティブバンドは、pEF-IP<sub>4</sub>BPでトランスフェクトした細胞では検出されるが、コントロール細胞では検出されなかった。検出されたバンドは60 Kと低分子量であった。この分子量は、N-グリコシダーゼFで処理した小脳由来IP<sub>4</sub>BP/syt IIと同一であることから、上記の分子量の相違は糖鎖の違いによることが証明された。また、コントロール(pEF-BOSトランスフェクトCOS7のヘパリン結合画分)、ヘパリン-アガロースで部分精製したpEF-IP<sub>4</sub>BP/syt II及び小脳由来IP<sub>4</sub>BP/syt II (各5.5 μg) の [<sup>3</sup>H] IP<sub>4</sub>結合を比較した。その結果を図9Bに示した。図に示されるように、pEF-IP<sub>4</sub>BP/syt IIのIP<sub>4</sub>結合活性は小脳由来のものとは比べて遜色なかった。

#### 【0050】実施例10

##### IP<sub>4</sub>BPのIP<sub>4</sub>結合領域同定

IP4BPのIP4結合領域を同定するために、膜貫通領域を除いたIP4BPとGSTの融合蛋白を9種類作製した。即ち、IP4BP/styIIの種々のドメインをコードするcDNA(図10A参照)をPCR法で増殖した。増殖したフラグメントは、pGEX-2Tにサブクローニングし、DNA配列を確認した。IP4BP/styIIの種々のドメインとGST(グルタチオンS-トランスフェラーゼ)との融合蛋白の調製は文献(Gene 67, 31-40, 1988)記載の方法に準じて行い、大腸菌JM109で発現させた。次いで、生成融合蛋白を、グルタチオン-セファロース4B(Pharmacia)クロマトグラフィーで精製し、SDS-PAGEで分析

Ile-His-Leu-Met-Gln-Asn-Gly-Lys-Arg-Leu-Lys-Lys-Lys-Thr-Thr-Val-  
Lys-Lys-Lys-Thr-Leu-Asn-Pro-Tyr-Phe-Asn-Glu-Ser-Phe-Ser-Phe- (2)

この領域はリジンリッチであり、マイナスにチャージしたIP4の結合に重要であると推測される。なお、他のリジンリッチ領域、例えばC2A領域或いはカゼインキナーゼIIの内在性ポリリジン刺激シグナルは、IP4結合活性は示さなかった。また、このIP4結合領域はイカシナプトタグミンのPep20ペプチド(IKKKKT TVKKCTLNPYYNESF; 即ち、Ile-Lys-Lys-Lys-Lys-Thr-Thr-Val-Lys-Lys-Cys-Thr-Leu-Asn-Pro-Tyr-Tyr-Asn-Glu-Ser-Phe)に相当することも判明した。また、このペプチドを、イカ巨大シナプス前終末に注入すると、神経伝達物質の放出が可逆的に抑制されることが示された。

#### 【0052】実施例11

##### GST-IP4BPのIP4結合性質

精製GST-f(GST-STII-C2B)に対するIP4結合のスカチャード分析を行った。その結果を図11Aに示す。この結果から、Kdは165nM、Bmaxは3.8pmol/μg蛋白であった。このKd値は、小脳由来IP4BP(Kd=40nM)よりも4倍も高い値を示した。当該GST-STII-C2Bはアフィニティが低い、その理由は、GSTと融合蛋白を形成しているためと推定される。

【0053】当該GST-STII-C2Bに対する各種イノシトールポリリン酸の結合能を測定した。その結果を図11Bに示す。図に示されるように、結合能は、Ins-1, 2, 3, 4, 5, 6-P6(IP6) > Ins-1, 3, 4, 5, 6-P5(IP5) > Ins-1, 3, 4, 5-P4(IP4) > Ins-2, 4, 5-P3 > Ins-1, 4, 5-P3(IP3) > Ins-1, 4-P2であった。つまり、Ins-1, 2, 3, 4, 5, 6-P6とIns-1, 3, 4, 5, 6-P5はIns-1, 3, 4, 5-P4より効果的な競合物質であった。このことから、IP4BP/styIIのC2B領域は、IP4だけでなくIP5及びIP6にも結合することを示している。精製小脳由来IP4BP/styIIに対しても、IP6を除いて同様の結

した。

【0051】9種類の融合蛋白において、GSTに結合させたドメインの違いは図10Aのようにマップされる。また、9種類の融合蛋白をGST-a~GST-iで表し、例えば、GST-aはGSTとドメインaとの融合蛋白を示す。これらの融合蛋白のIP4結合性を、前述の方法で試験した。その結果を図10Bに示す。図に示されるように、IP4結合活性はC2B領域の中央部に存在することが判明した。そのアミノ酸配列は、アミノ酸番号315-346のIHLMQNGKRLKKKKT TVKKCTLNPYYNESFSF、即ち、下記式(2)に相当した。

果が得られた。また、ヘパリンはIP4のIP4BP/styIIへの結合阻害を示すが、GST-STII-C2Bでも同様であった。

#### 【0054】実施例12

##### IP4の結合部位についての検討

C2ドメインはシナプトタグミンI、PKCαやrabphilin 3Aにも存在することが知られている(Rose John et al. Gene 74, 465-471, 1988)。そこで、C2Bドメインに対するIP4結合が、IP4BP/styIIにユニークであるかどうかを確認した。即ち、実施例10に記載した方法に準じて、シナプトタグミンI、rabphilin 3A(rph)及びPKCαの蛋白とGSTとの融合蛋白を調製し、IP4結合能を測定した。その結果を図12に示す。なお、同図において、例えば、GST-STII-C2Aは、GSTとシナプトタグミンC2Aドメインとの融合蛋白を意味する。図に示されるように、IP4の結合はシナプトタグミンI、IIのC2Bドメインに特異的であることが判明した。そこで、種々の生物由来シナプトタグミンC2Bドメインの前記式(2)に相当するアミノ酸配列を比較した(図13参照)。そして、IP4の結合部位は、GKR(L/I)KKKKT(T/S)(V/I)KK、即ち前記式(1)に存在すると推察された。即ち、図13の配列において、C末端側の配列はよく保存されており、シナプトタグミンC2Aドメインでも見られる配列であるが、シナプトタグミンC2AドメインはIP4に結合しないこと; PKCα及びrabphilin 3AのC2ドメインもIP4には結合しないが、これらのドメインには上記式(1)のアミノ酸配列が存在しないことなどから、式(1)で示されるペプチドがIP4の結合部位であると判断した。

#### 【0055】実施例13

##### C2ドメインのホスホリピッド結合性質

シナプトタグミンIのC2Aドメインがあれば、Ca<sup>2+</sup>依存性ホスホリピッドの結合に十分であるとの報告があるが、その詳細は不明である。シナプトタグミンのC2B

ドメインに対するイノシトールホスフェートとホスホリ  
 ピド結合の関係を明らかにすべく、GST融合蛋白でホ  
 スホリピド結合試験を実施した。即ち、リボソーム（ホ  
 スファチジルセリン／ホスファチジルエタノールアミン  
 （1：1、w/w））とGST融合蛋白を、50mM  
 H e p e s - N a O H （pH7.4）、室温で15分間  
 インキュベートした。1200gで10分間遠心後、ペ  
 レット（ホスホリピド結合画分）と上清（非結合画分）  
 を分画した。次に、両画分を10%SDS-PAGEに  
 供した。その結果を図14に示す。同図において、レー  
 ン1：上清-Ca<sup>2+</sup>、レーン2：ペレット-Ca<sup>2+</sup>、レー  
 ン3：上清+1mM Ca<sup>2+</sup>、レーン4：ペレット+  
 Ca<sup>2+</sup>；a) GST-STII-C2A、b) GST-  
 STII-C2B、c) GST-STII-C2B（3  
 27番目のLysをGlnに）、d) GST-STI-  
 C2A、e) GST-STI-C2B、f) GST-C  
 2A+C2B、g) GST-rph-C2A、h) GS  
 T-rph-C2B、i) GSTを示す。

【0056】つまり、GST-STI-C2AとGST  
 -STII-C2Aは、Ca<sup>2+</sup>依存性にリボソーム  
 （1：1（w/w）ホスファチジルセリン：ホスファチ  
 ジルエタノールアミン）に結合したが、GST-STI  
 -C2BとGST-STII-C2BはCa<sup>2+</sup>非依存性

に結合することが判明した。また、GST-r a b p h  
 i l i n 3 A（r p h）-C2AはCa<sup>2+</sup>依存性にホス  
 ホリピド結合活性を有するが、GST-r p h-C2B  
 はCa<sup>2+</sup>存在下でも結合しないことが判明した。すなわ  
 ち、シナプトタグミンやr a b p h i l i n 3 AのC2  
 Aドメインは、PKCαのC2ドメインにその機能が類  
 似してCa<sup>2+</sup>依存性であるが、C2Bドメインは異なる  
 ことが示唆される。GST-STII-C2Bの327  
 番目のアミノ酸をリジンからグルタミンに変えるとホス  
 ホリピド結合活性は失われるが、IP4結合活性は50  
 %維持された。すなわち、IP4とホスファチジルセリ  
 ンはC2Bドメインの似た領域に結合するものの、認識  
 サイトは若干異なることが判明した。

【0057】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1876

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA t o mRNA

起源：マウス小脳

配列

ATC CCC TCT GCC ACC ATG AGA AAC ATC TTC AAG AGG AAC CAG GAG CCA	48
Met Arg Asn Ile Phe Lys Arg Asn Gln Glu Pro	
1 10	
AAT GTG GCT CCG GCC ACC ACC ACT GCC ACA ATG CCC CTT GCA CCC GTC	96
Asn Val Ala Pro Ala Thr Thr Thr Ala Thr Met Pro Leu Ala Pro Val	
20	
GCA CCT GCC GAC AAC TCT ACA GAG AGC ACG GGT CCT GGG GAG AGC CAA	144
Ala Pro Ala Asp Asn Ser Thr Glu Ser Thr Gly Pro Gly Glu Ser Gln	
30 40	
GAA GAC ATG TTC GCC AAG CTG AAG GAG AAA TTC TTC AAT GAG ATC AAC	192
Glu Asp Met Phe Ala Lys Leu Lys Glu Lys Phe Phe Asn Glu Ile Asn	
50	
AAG ATC CCC TTG CCC CCC TGG GCT CTG ATC GCC ATG GCT GTG GTT GCT	240
Lys Ile Pro Leu Pro Pro Trp Ala Leu Ile Ala Met Ala Val Val Ala	
60 70	
GGC CTC CTG CTG CTC ACC TGT TGC TTC TGC ATC TGT AAG AAG TGC TGC	288
Gly Leu Leu Leu Leu Thr Cys Cys Phe Cys Ile Cys Lys Lys Cys Cys	
80 90	
TGC AAG AAG AAG AAC AAG AAG GAG AAG GGC AAA GGC ATG AAG AAC	336
Cys Lys Lys Lys Lys Asn Lys Lys Glu Lys Gly Lys Gly Met Lys Asn	
100	
GCC ATG AAC ATG AAG GAC ATG AAA GGC GGC CAG GAT GAC GAT GAT GCA	384
Ala Met Asn Met Lys Asp Met Lys Gly Gly Gln Asp Asp Asp Ala	
110 120	
GAG ACA GGC CTG ACT GAA GGA GAA GGT GAA GGC GAG GAG GAG AAA GAG	432
Glu Thr Gly Leu Thr Glu Gly Glu Gly Glu Gly Glu Glu Lys <u>Glu</u>	

130

CCA GAG AAC CTG GGC AAA TTG CAG TTT TCT CTG GAC TAT GAT TTC CAG 480  
Pro Glu Asn Leu Gly Lys Leu Gln Phe Ser Leu Asp Tyr Asp Phe Gln  
140 150

GCC AAC CAG CTC ACC GTG GGT GTC CTG CAG GCT GCG GAA CTC CCA GCC 528  
Ala Asn Gln Leu Thr Val Gly Val Leu Gln Ala Ala Glu Leu Pro Ala  
160 170

CTG GAC ATG GGT GGC ACA TCA GAC CCT TAT GTC AAA GTC TTC CTC CTC 576  
Leu Asp Met Gly Gly Thr Ser Asp Pro Tyr Val Lys Val Phe Leu Leu  
180

CCA GAC AAG AAG AAG AAA TAT GAG ACT AAG GTG CAT CGG AAG ACG CTG 624  
Pro Asp Lys Lys Lys Lys Tyr Glu Thr Lys Val His Arg Lys Thr Leu  
190 200

AAC CCA GCC TTC AAT GAG ACA TTC ACT TTC AAG GTG CCA TAC CAG GAG 672  
Asn Pro Ala Phe Asn Glu Thr Phe Thr Phe Lys Val Pro Tyr Gln Glu  
210

TTA GGA GGC AAG ACC CTG GTG ATG GCA ATC TAT GAC TTT GAC CGC TTC 720  
Leu Gly Gly Lys Thr Leu Val Met Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Arg Phe  
220 230

TCT AAG CAT GAC ATC ATC GGG GAG GTG AAG GTA CCC ATG AAC ACA GTG 768  
Ser Lys His Asp Ile Ile Gly Glu Val Lys Val Pro Met Asn Thr Val  
240 250

GAC CTT GGC CAG CCC ATC GAG GAA TGG AGA GAC CTA CAA GGC GGA GAG 816  
Asp Leu Gly Gln Pro Ile Glu Glu Trp Arg Asp Leu Gln Gly Gly Glu  
260

AAG GAA GAG CCA GAG AAG TTG GGT GAC ATC TGT ACC TCC TTG CGC TAC 864  
Lys Glu Glu Pro Glu Lys Leu Gly Asp Ile Cys Thr Ser Leu Arg Tyr  
270 280

GTG CCC ACA GCT GGG AAG CTC ACC GTC TGT ATC CTG GAG GCC AAG AAC 912  
Val Pro Thr Ala Gly Lys Leu Thr Val Cys Ile Leu Glu Ala Lys Asn  
290

CTG AAG AAG ATG GAC GTA GGG GGC CTT TCA GAC CCC TAT GTG AAG ATC 960  
Leu Lys Lys Met Asp Val Gly Gly Leu Ser Asp Pro Tyr Val Lys Ile  
300 310

CAC CTG ATG CAG AAC GGT AAG AGA CTC AAG AAG AAG AAG ACG ACA GTG 1008  
His Leu Met Gln Asn Gly Lys Arg Leu Lys Lys Lys Lys Thr Thr Val  
320 330

AAG AAG AAG ACC CTG AAC CCC TAC TTC AAC GAG TCC TTC AGC TTC GAG 1056  
Lys Lys Lys Thr Leu Asn Pro Tyr Phe Asn Glu Ser Phe Ser Phe Glu  
340

ATC CCC TTT GAG CAG ATC CAG AAA GTC CAG GTG GTC GTC ACC GTG CTA 1104  
Ile Pro Phe Glu Gln Ile Gln Lys Val Gln Val Val Val Thr Val Leu  
350 360

GAC TAC GAC AAA CTG GGC AAG AAT GAA GCC ATC GGA AAG ATC TTT GTA 1152  
Asp Tyr Asp Lys Leu Gly Lys Asn Glu Ala Ile Gly Lys Ile Phe Val  
370

GGC AGC AAC GCC ACA GGC ACC GAG TTG CGG CAC TGG TCC GAC ATG CTG 1200  
Gly Ser Asn Ala Thr Gly Thr Glu Leu Arg His Trp Ser Asp Met Leu  
380 390

GCC AAC CCT CGG AGG CCC ATT GCC CAG TGG CAC TCT CTT AAG CCT GAG 1248

Ala Asn Pro Arg Arg Pro Ile Ala Gln Trp His Ser Leu Lys Pro Glu  
 400 410  
 GAA GAA GTG GAT GCT CTT CTG GGC AAG AAC AAG TAG GCT CCA GCG GCC 1296  
 Glu Glu Val Asp Ala Leu Leu Gly Lys Asn Lys \*  
 420 422  
 GGT GCC ACG CCC CTA AGG AGC CAC GCC CCC GAG GCG CCA CGC CCC CTG 1344  
 AGG ACA CTG ACG AGA TCC AGA GCT ATC AAT ACC TCA GTT ACG CGA CCT 1392  
 TAG AGG TTT CTT CAT TTG TTT GCG GTG TGT CCT GTT TTT CCT TCC TTT 1440  
 TTC TCT TTT TAA AGA CCA ACT TCC TTT TGG TGG CTG TGT GAA GAG AGT 1488  
 CCC CTA AGA GGT GAA AGA AAA GCC TGG CTC TGT TAT TGT CCC CGG AGC 1536  
 GGT CCT TGT TGC ATG CCC TTT CAC GGT TTC CCC CTT ACC CCA AGT GGG 1584  
 GCC CTC TAC TGT CAG ACA GTT GAA GCA CTA ACT GCT TTT CCT GGG TTT 1632  
 TGG ACC AAC AAC ATG GCA AGC ACA TTC TGT TTC TTG ACT GTG AAG GCA 1680  
 ACA TAG TGG CCA GCA TTG TGT GTG TGT GTG TGT GTG TGT GTG TGT ATG 1728  
 TGT GTG TGT ACA CCT GTA TGT GCC CAT CCA TCC CCA CCT GCC TGT TTT 1776  
 GAA CAT CTC TCT TCA TTT TCT GGA ATG AGT CAT GGA CAG TGA AGC CAT 1824  
 GTG AGA GGA GAA TGT CTT CAG AGA CTC CAA GGG AAA GCA AGC CCA CTG 1872  
 CCT G 1876

【0058】配列番号：2

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：422

配列の種類：ペプチド

配列

Met Arg Asn Ile Phe Lys Arg Asn Gln Glu Pro Asn Val Ala Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Thr Thr Thr Ala Thr Met Pro Leu Ala Pro Val Ala Pro Ala  
 20 25 30  
 Asp Asn Ser Thr Glu Ser Thr Gly Pro Gly Glu Ser Gln Glu Asp  
 35 40 45  
 Met Phe Ala Lys Leu Lys Glu Lys Phe Phe Asn Glu Ile Asn Lys  
 50 55 60  
 Ile Pro Leu Pro Pro Trp Ala Leu Ile Ala Met Ala Val Val Ala  
 65 70 75  
 Gly Leu Leu Leu Leu Thr Cys Cys Phe Cys Ile Cys Lys Lys Cys  
 80 85 90  
 Cys Cys Lys Lys Lys Lys Asn Lys Lys Glu Lys Gly Lys Gly Met  
 95 100 105  
 Lys Asn Ala Met Asn Met Lys Asp Met Lys Gly Gly Gln Asp Asp  
 110 115 120  
 Asp Asp Ala Glu Thr Gly Leu Thr Glu Gly Glu Gly Glu Gly Glu  
 125 130 135  
 Glu Glu Lys Glu Pro Glu Asn Leu Gly Lys Leu Gln Phe Ser Leu  
 140 145 150  
 Asp Tyr Asp Phe Gln Ala Asn Gln Leu Thr Val Gly Val Leu Gln  
 155 160 165  
 Ala Ala Glu Leu Pro Ala Leu Asp Met Gly Gly Thr Ser Asp Pro  
 170 175 180  
 Tyr Val Lys Val Phe Leu Leu Pro Asp Lys Lys Lys Lys Tyr Glu  
 185 190 195  
 Thr Lys Val His Arg Lys Thr Leu Asn Pro Ala Phe Asn Glu Thr  
 200 205 210  
 Phe Thr Phe Lys Val Pro Tyr Gln Glu Leu Gly Gly Lys Thr Leu

	215	220	225
Val Met Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Arg Phe Ser Lys His Asp Ile			
	230	235	240
Ile Gly Glu Val Lys Val Pro Met Asn Thr Val Asp Leu Gly Gln			
	245	250	255
Pro Ile Glu Glu Trp Arg Asp Leu Gln Gly Gly Glu Lys Glu Glu			
	260	265	270
Pro Glu Lys Leu Gly Asp Ile Cys Thr Ser Leu Arg Tyr Val Pro			
	275	280	285
Thr Ala Gly Lys Leu Thr Val Cys Ile Leu Glu Ala Lys Asn Leu			
	290	295	300
Lys Lys Met Asp Val Gly Gly Leu Ser Asp Pro Tyr Val Lys Ile			
	305	310	315
His Leu Met Gln Asn Gly Lys Arg Leu Lys Lys Lys Lys Thr Thr			
	320	325	330
Val Lys Lys Lys Thr Leu Asn Pro Tyr Phe Asn Glu Ser Phe Ser			
	335	340	345
Phe Glu Ile Pro Phe Glu Gln Ile Gln Lys Val Gln Val Val Val			
	350	355	360
Thr Val Leu Asp Tyr Asp Lys Leu Gly Lys Asn Glu Ala Ile Gly			
	365	370	375
Lys Ile Phe Val Gly Ser Asn Ala Thr Gly Thr Glu Leu Arg His			
	380	385	390
Trp Ser Asp Met Leu Ala Asn Pro Arg Arg Pro Ile Ala Gln Trp			
	395	400	405
His Ser Leu Lys Pro Glu Glu Glu Val Asp Ala Leu Leu Gly Lys			
	410	415	420
Asn Lys *			
422			

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】各クロマトグラフィーによるIP4BPの精製工程を示す図である。

【図2】IP4BP精製工程における各画分のSDS-PAGE分析の結果を示す図(A, B)である。なお、CはSDS-PAGE分析による分子量の測定を示す図である。

【図3】SDS-PAGEで分離したIP4BP(140k及び65k)のリジルエンドペプチダーゼ分解物のHPLC分析を示す図(A)、及び分離した画分(1-7)のアミノ酸配列とラットシナプトタグミンIIのアミノ酸配列の比較を示す図(B)である。図Aにおいて、(a)は140kの分解物、(b)は65k分解物を示す。

【図4】粗及び精製IP4BPのイムノブロット分析の結果を示す図である。図において、aは粗IP4BP、bは精製IP4BPを示す。また、Aはアミノブラックで染色したもの、BはシナプトタグミンC2A領域に対する抗体で反応させたもの、CはシナプトタグミンC末端領域に対する抗体で反応させたもの、Dはコントロール抗体で反応させたものを示す。

【図5】抗体存在下におけるIP4BPのIP4結合特性を示す図である。図において、○はシナプトタグミンC2A領域に対する抗体の存在下、●はコントロール抗体存在下を示す。

【図6】IP4BPのIP4結合に対するpH依存性を示す図である。

【図7】IP4BPに対する<sup>3</sup>H IP4の結合の飽和性及びスカッチャド分析を示す図である。

【図8】IP4BPと種々のイノシトールポリリン酸との結合特性を示す図である。図において、▲はIP3、●はIP4、○はIns 3, 4, 5, 6-P4、■はIP5、□はIP6を示す。

【図9】遺伝子組換え技術により発現したIP4BP/syt II (pEF-IP4BP/syt II)のイムノブロット分析の結果(A)、及び<sup>3</sup>H IP4結合能(B)を示す図である。なお、図Aにおいて、レーン1はコントロール、レーン2はpEF-IP4BP/syt II、レーン3はマウス小脳ミクロゾーム画分を示す。

【図10】実施例10で調製した、GSTと各種シナプトタグミンドメインとの融合蛋白において、GSTに結

合させたシナプトタグミンドメインの位置を示す図  
(A)、及び当該融合蛋白のIP4結合能を示す図  
(B)である。

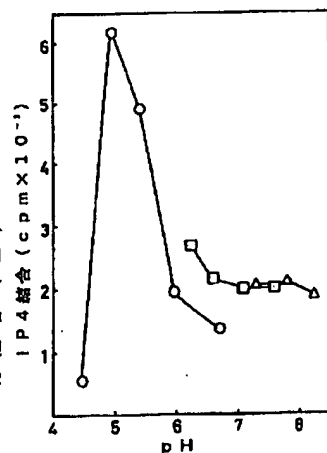
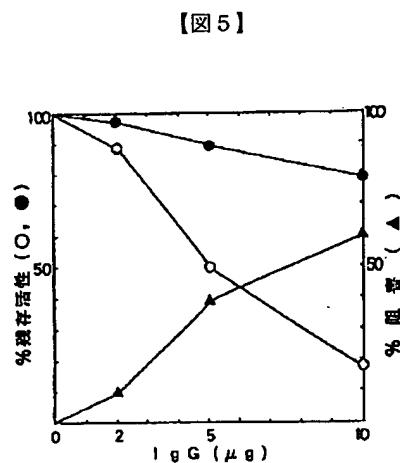
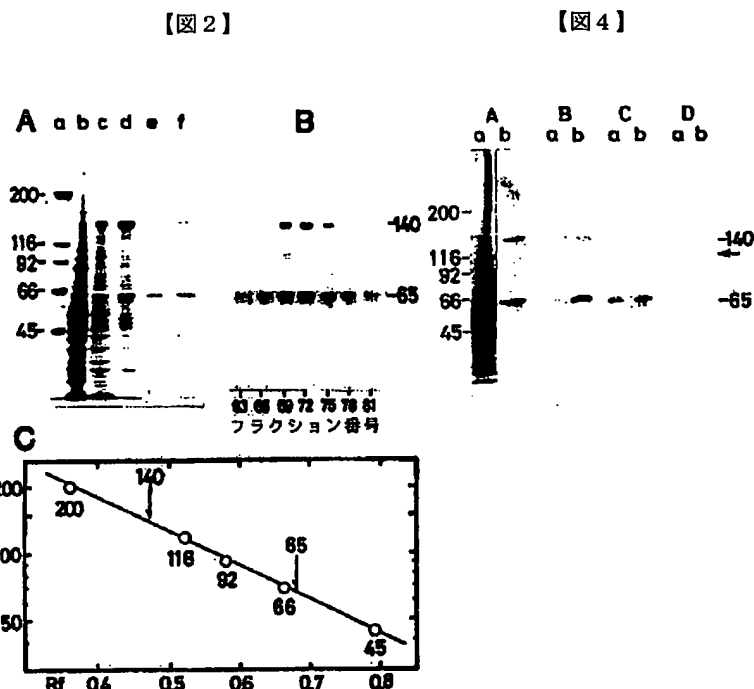
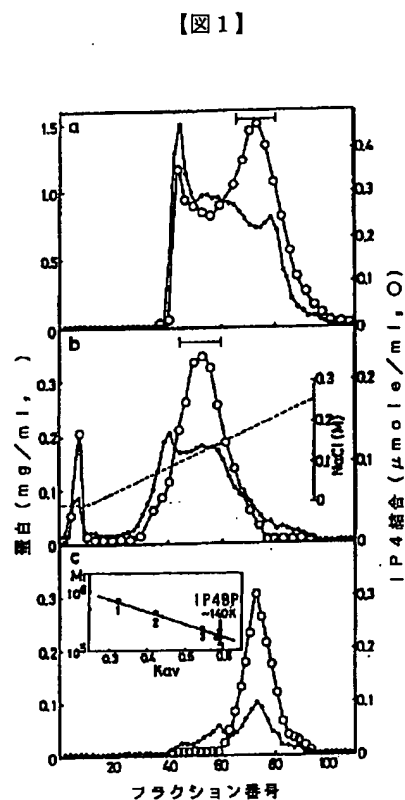
【図11】融合蛋白GST-STII-C2Bのスカッ  
チャド分析の結果を示す図(A)、及び種々のイノシト  
ールポリリン酸との結合能を示す図(B)である。

【図12】GSTと種々のC2ドメインとの融合蛋白の  
IP4結合能を示す図である。

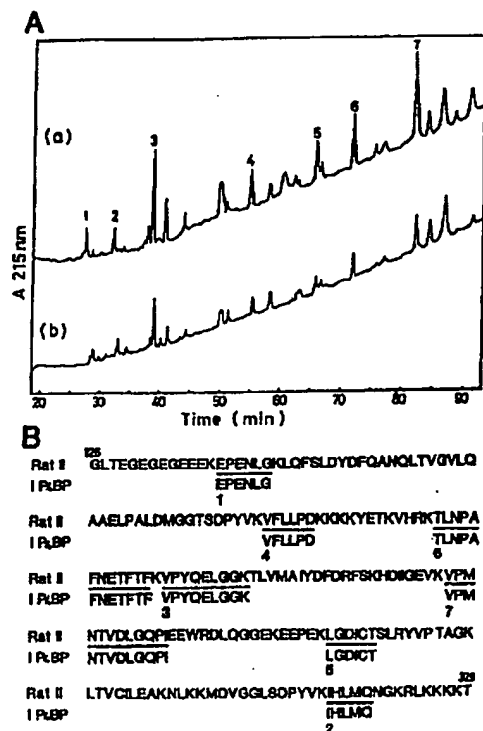
【図13】種々の生物由来シナプトタグミンC2ドメ  
インの式(2)相当領域のアミノ酸配列を比較した図で

ある。図において、MIIはマウスシナプトタグミンI  
I、MIはマウスシナプトタグミンI、HIはヒトシナ  
プトタグミンI、BIはウシシナプトタグミンI、RA  
はシビレエイシナプトタグミンA、RBはシビレエイ  
シナプトタグミンB、SIはイカシナプトタグミン  
I、DIはショウジョウバエシナプトタグミンI、C  
Iは線虫シナプトタグミンIを示す。

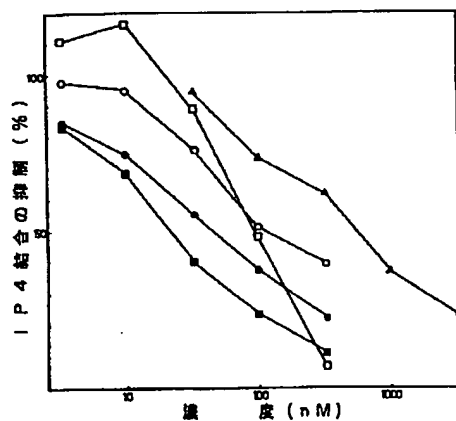
【図14】GST-各種C2ドメイン融合蛋白について  
のホスホリビッド結合性を示す図である。



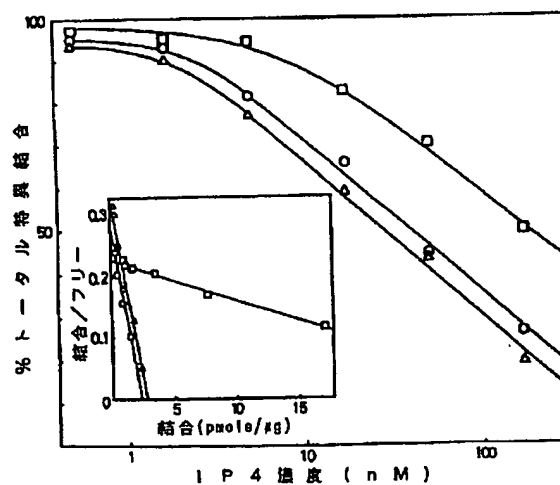
【図3】



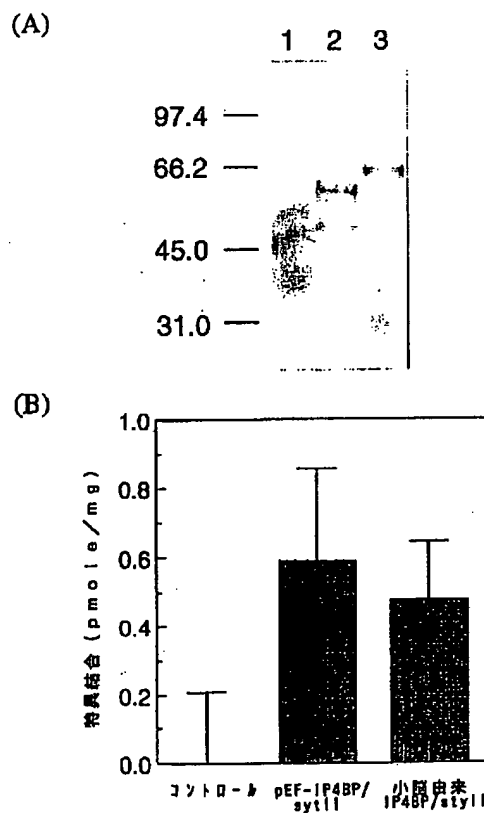
【図8】



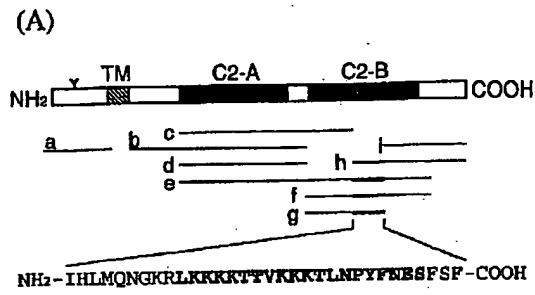
【図7】



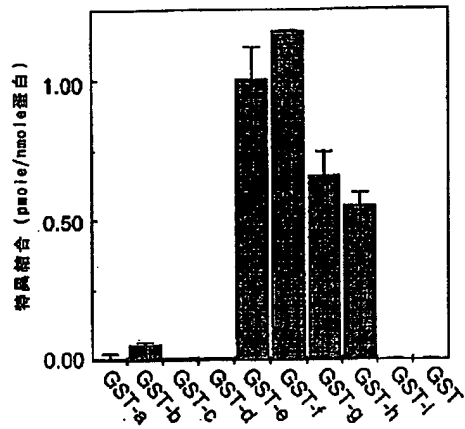
【図9】



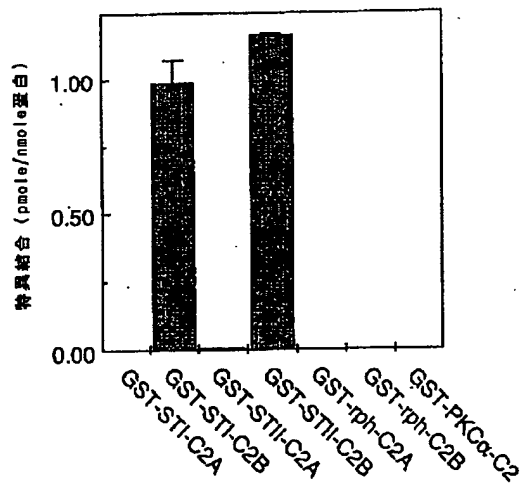
【図10】



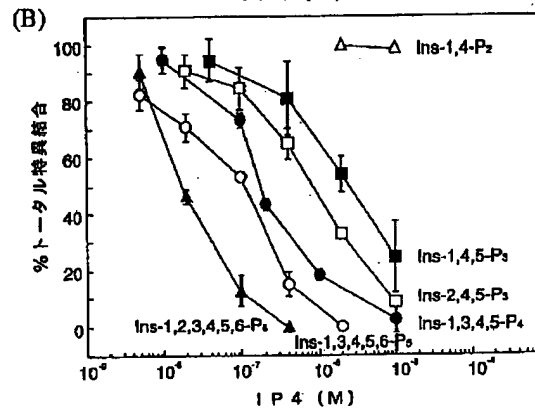
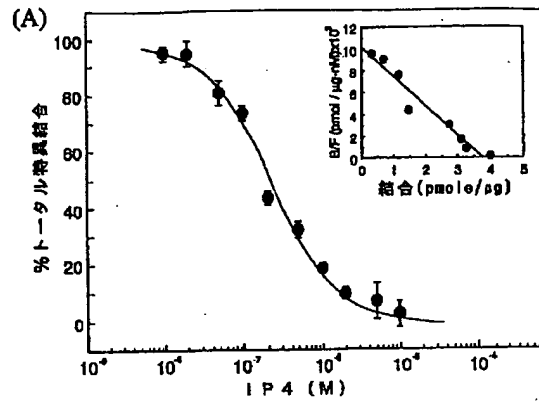
(B)



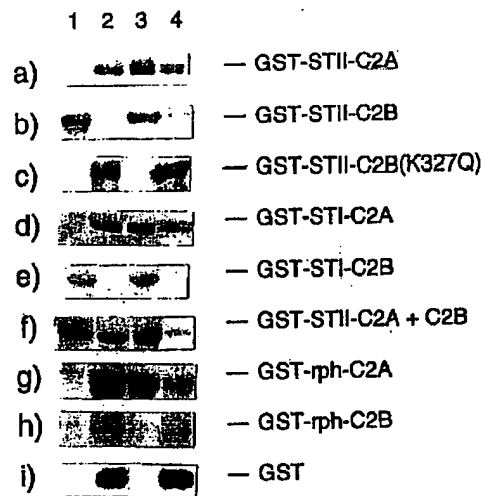
【図12】



【図11】



【図14】



【図13】

	1	5	10	15	20	25	30
MII	I	H	L	M	Q	N	G
MI	:	:	:	:	:	:	:
HI	:	:	:	:	:	:	:
BI	:	:	:	:	:	:	:
RA	:	:	:	:	:	:	:
RB	:	:	:	:	:	:	:
SI	:	:	:	:	:	:	:
DI	:	:	:	:	:	:	:
CI	:	:	:	:	:	:	:
コンセンサス	I	I	SV	F	A		

**INOSITOL POLYPHOSPHATE-BONDING PEPTIDE**

Patent Number: JP8092290

Publication date: 1996-04-09

Inventor(s): MIKOSHIBA KATSUHIKO

Applicant(s): SOOSEI:KK

Requested Patent: ☐ JP8092290

Application Number: JP19940252942 19940920

Priority Number(s):

IPC Classification: C07K14/47; A61K38/00; C07K7/08; G01N33/53

EC Classification:

Equivalents:

---

**Abstract**

---

**PURPOSE:** To obtain an inositol polyphosphate-bonding peptide useful for studying action of inositol polyphosphate, as a Ca release inhibitor and for treating and diagnosing diseases caused by an inositol polyphosphate, having a specific amino acid sequence and capable of being bonded to inositol polyphosphate.

**CONSTITUTION:** This new peptide has an amino acid sequence of the formula (X1 is Leu or Ile; X2 is Thr or Ser; X3 is Ile or Val), is a peptide constituting C2B domain of synaptotagmin I or II, has bonding ability to an inositol polyphosphate such as inositol tetrakisphosphate, inositol pentakisphosphate or inositol hexakisphosphate and is useful as a reagent for studying action and mechanism of the inositol polyphosphate, as a Ca release inhibitor and for diagnosing and treating various diseases concerned in the inositol polyphosphate. The peptide is obtained by extracting a protein from a cerebellum of a mouse and purifying the protein by a heparin-immobilized column.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2